

**TRANSDUCTION OF GENE INTO PLANT CELL**

Patent Number: JP4027393  
Publication date: 1992-01-30  
Inventor(s): KAWAI KOICHI  
Applicant(s): ISEKI & CO LTD  
Requested Patent: ☐ JP4027393  
Application Number: JP19900132043 199 00522  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12N15/87; A01H1/00; C12N13/00  
EC Classification:  
Equivalents:

**Abstract**

**PURPOSE:** To transduce a breeding gene into a plant cell without damaging the cell by immersing a plant cell in a buffer solution containing target DNA and introducing the DNA into the cell by electroporation in a plasmolyzed state.

**CONSTITUTION:** Target DNA 4 is mixed into a buffer solution and a plant cell 1 such as a piece of tobacco leaf is immersed in the solution to separate the cell membrane 3 from the cell wall 2 of the cell 1 and cause the plasmolysis. The cell 1 is electroporated by applying 1-10 pulses having a pulse height of 0.5-0.8kV/cm, pulse-width of 6 $\mu$ s to 10ms and pulse spacing of 0.5-10sec to effect the gene transduction of the target DNA 4 into the cell 1. The cell is put into a dilute buffer solution to restore the plasmolyzed cell 1, planted on a medium 7 in a test tube 6, transplanted into a flask 8 after sprouting and cultivated to obtain a plant body 10.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

## ⑫ 公開特許公報(A) 平4-27393

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)1月30日

C 12 N 15/87  
A 01 H 1/00  
C 12 N 13/00

A 8502-2B  
2121-4B  
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全2頁)

⑭ 発明の名称 植物細胞への遺伝子導入法

⑯ 特 願 平2-132043

⑰ 出 願 平2(1990)5月22日

⑱ 発 明 者 河 合 浩 一 愛媛県伊予郡砥部町八倉1番地 井関農機株式会社技術部  
内

⑲ 出 願 人 井関農機株式会社 愛媛県松山市馬木町700番地

⑳ 代 理 人 弁理士 牧 哲 郎 外2名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

植物細胞への遺伝子導入法

## 2. 特許請求の範囲

緩衝溶液にターゲットDNAを混入し、これに植物細胞を浸漬して原形質分離を起こさせた状態で該細胞にエレクトロポレーションにより前記ターゲットDNAを導入することを特徴とする植物細胞への遺伝子導入法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、植物の品種改良の際の遺伝子導入法に関する。

(従来技術)

エレクトロポレーションにより遺伝子を導入するには、細胞壁が邪魔であるので、細胞をプロトプラストにしてからエレクトロポレーションにより遺伝子を導入していた。

(発明が解決しようとする課題)

このため、細胞をプロトプラストにする操作が

必要になるうえ、プロトプラストを植物体に再生するための培地や温度等の条件が厳しく、再生するのが非常に困難であった。さらに、プロトプラストにする際に細胞を傷めてしまうという欠点もあった。

(課題を解決するための手段)

上記課題を解決するために本発明は、緩衝溶液にターゲットDNAを混入しこれに植物細胞を浸漬して原形質分離を起こさせた状態で、この細胞にエレクトロポレーションにより前記ターゲットDNAを導入しすることとした。

(作用)

細胞は原形質分離を起こしているので、細胞壁を通りターゲットDNAが容易に入る。こうして次に、エレクトロポレーションにより遺伝子を細胞膜内に導入すれば、プロトプラストにしてから導入するのと同様の操作で遺伝子導入ができる。

(実施例)

本発明実施例につき図面を参照して説明する。

タバコの葉片の細胞1を、通常の緩衝溶液にマ

ンニトールを0.4～0.6M加えた溶液に浸す（第1図参照）。この際、前記緩衝溶液にターゲットDNA4を混入しておく。

すると、前記細胞は細胞壁2から細胞膜3が離れ、原形質分離を起こす。この時、細胞壁2からターゲットDNA4が入る（第2図参照）。

次に、細胞1にエレクトロポレーションの条件を、電圧0.5～0.8kV/cm、パルスの持続時間6 $\mu$ s～10ms、パルス間隔0.5～10s、パルス印加回数1～10回としてターゲットDNA4を遺伝子導入する（第3図参照）。

次に、薄い緩衝溶液に入れて原形質分離した細胞1を元に戻す（第4図、第5図参照）。

こうしてなる細胞を第6図に示すように試験管6内の培地7に植付ける。萌芽後フラスコ8内の培地9に移植し、培養して植物体10に再生する（第7図参照）。

（発明の効果）

細胞壁を酵素処理して除去する従来のプロトプラストを用いた方法に比べて、細胞壁を除去する

必要がないため、より簡単にエレクトロポレーションによる遺伝子導入ができる。しかも酵素により細胞が破壊される危険もないので、植物体に再生しやすくなるという効果を奏する。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は植物細胞を緩衝溶液に浸した状態の図、第2図は原形質分離を起こした状態の図、第3図はエレクトロポレーションを行っている状態の図、第4図は遺伝子を導入した状態の図、第5図は原形質分離を起こしていた細胞を元に戻した状態の図、第6図はこの細胞を培地に植付けて培養した状態の図、第7図は植物体に再生した状態の図である。

1は植物細胞、2は細胞壁、3は細胞膜、4はターゲットDNA、5は核、6は試験管、7、9は培地、8はフラスコ、10は植物体。

特許出願人 井関農機 株式会社  
代理人 牧 哲郎（ほか3名）

